

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



**Markéta Kostříková**

**Využití pasívních vzorkovačů při identifikaci reziduí antibiotik v přečištěných  
odpadních vodách**

The use of passive samplers in the identification of antibiotics residues in treated waste water

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Petra Innemanová, PhD.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci sepsala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce, ani její větší část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Tištěná verze práce je shodná s verzí nahranou v SIS.

V Praze,

Podpis

**Poděkování:**

Největší dík patří mé školitelce RNDr. Petře Innemanové PhD. za vedení mé bakalářské práce, za odborné rady, vstřícnost, trpělivost a lidský přístup, za který jsem byla moc vděčná.

Dále bych moc chtěla poděkovat mé rodině za jejich neustálou podporu při mém studiu.

# Obsah

1	Abstrakt .....	5
2	Seznam zkratek .....	7
3	Úvod .....	9
4	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
4.1	Pasivní vzorkování .....	10
4.1.1	Princip pasivního vzorkování .....	11
4.2	Farmaceutické látky v životním prostředí .....	17
4.2.1	Antibiotika .....	17
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
5.1	Použitý materiál a přístroje .....	23
5.1.1	Materiál a chemikálie .....	23
5.1.2	Přístroje .....	23
5.2	Umístění vzorkovačů .....	23
5.3	Optimalizace metody stanovování – popis a průběžné výsledky .....	25
5.3.1	Extrakce methanolem .....	26
5.4	Reálné vzorky z lokality .....	27
6	Diskuze a závěr .....	28
7	Seznam použité literatury .....	29

# 1 Abstrakt

S růstem lidské společnosti přibývá i spotřeby antibiotik, která se ve velké míře dostávají zpět do životního prostředí a v podobě jejich reziduí nebo metabolitů tam působí negativně na necílové organismy. Hlavními zdroji těchto sloučenin je lidská a veterinární medicína, zemědělství a živočišná výroba.

Teoretická část této práce je rozdělena na dvě kapitoly. Na problematiku metod pasivního vzorkování, kde je probrána jejich využitelnost a výhody oproti aktivnímu vzorkování, mezi které patří rychlost, relativní nenákladovost, nulový přísun vnější energie a sběr vzorků *in situ*. Jsou zde popsány principy práce základních typů vzorkovačů primárně určených pro identifikaci cizorodých částic ve vodním prostředí. Jedná se o Gore-Sorber, PDB, SPMD, POCIS, Chemcatcher, Keramický dozimetr, PISCES, MESCO a SLMD.

Druhá kapitola se zabývá farmaceutickými látkami, detailněji antibiotiky vyskytujícími se v přírodním prostředí (Streptomycin, Amoxicilin, Ciprofloxacin, Lincomycin, Erythromycin, Spiramycin, Flumequin, Ofloxacin, Sulfamethoxazol, Chlortetracyklin, Oxytetracyklin) a metodami jejich detekce.

V experimentální části byla hodnocena možnost využití pasivních vzorkovačů při identifikaci reziduí antibiotik v odpadních vodách pomocí plotnové difuzní metody.

Klíčová slova: pasivní vzorkovač, rezidua antibiotik, přečištěná voda

# Abstract

With the increasing number of people on the planet, increases the consumption of antibiotics as well. A very big part of these antibiotics are transferred back into the environment in form of either their residues or metabolites. They usually negatively effect non-target organisms. Main sources of antibiotics are human and veterinary medicine, agriculture and animal production.

The teoretical part of this thesis is devided into two chapters. In the first one the problematics of passive sampling, its usability and advantages compared to active sampling is discussed. These advantages are speed, low costs, no need for supply of outer energy and collection of samples *in situ*. Basic types of passive samplers that are intended for identification of foreign particles in the aquatic environment are described. Those described are Gore-Sorber, PDB, SPMD, POCIS, Chemcatcher, Ceramic Dosimeter, PISCES, MESCO a SLMD.

The second chapter is about pharmaceuticals, more in depth about antibiotics in the environment such as Streptomycin, Amoxicilin, Ciprofloxacin, Lincomycin, Erythromycin, Spiramycin, Flumequin, Ofloxacin, Sulfamethoxazol, Chlortetracyklin, Oxytetracyklin, and methods of their detection.

In the experimental part the possibility of combinig the advantages of passive sampling with the plate diffusion method is evaulated.

Key words: passive sampler, antibiotics residues, cleaned water

## 2 Seznam zkratek

AU	Aktivní uhlí
BTEX	Benzen, Toluén, Ethylbenzen, Xylen
ČOV	Čistička odpadních vod
DDT	Dichlor-Difenyl-Trichlorethan
DET	Diffusion Ekvilíbrio in Thin-films device
DGT	Diffusive Gradient in Thin-films device
ESI	Electrospray Ionization (Ionizace elektrosprejem)
GC	Gas Chromatography (Plynová chromatografie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IU	International Unit (Mezinárodní jednotka)
LDPE	Low Density Polyethylene (Nízko-hustotní polyethylen)
MBC	Minimal Bactericidal Concentration (Minimální baktericidní koncentrace)
MIC	Minimal Inhibitory Concentration (Minimální inhibiční koncentrace)
MESCO	Membrane-Enclosed Sorptive Coating
MTBE	Methyl Tert-Butyl Ether
MS	Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie)
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Polycyklické aromatické uhlovodíky)
PDB	Passive diffusion bag samplers
POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
PRC	Permeability Reference Compound
POPs	Persistent Organic Pollutants (Perzistentní organické polutanty)
PCBs	Polychlorinated Biphenyls (Polychlorované bifenylly)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
RP-LC	Reversed Phase-Liquid ChromatographyMeth

SPE	Solid Phase Extraction (Extrakce pomocí tuhé fáze)
SLMD	Stabilized Liquid-Membrane Device (vzorkovač se stabilizovanou tekutou membránou)
SPMD	Semi-Permeable Membrane Device (vzorkovač s polopropustnou membránou)
SVOCs	Semi-Volatile Organic Compounds (Polo-těkavé organické látky)
TWA	Time-Weighted Average (Časově vážený průměr)
VOC	Volatile Organic Compounds (Těkavé organické látky)



### 3 Úvod

Vzorkování je jednoznačně neodmyslitelnou součástí analytických postupů. Správné vzorkování je pro potenciální experiment naprosto krucální. Totiž případné chyby vzniklé při měření už v tomto stádiu, nejsou v nadcházejících analýzách opravitelné. Podle mnohých odhadů, zabírá vzorkování a příprava vzorků přibližně 70-90 % celkového času analýzy. Proto je nepřetržitě vyvíjen tlak na zefektivnění a zrychlení této fáze výzkumu. Převažujícími trendy jsou kombinace několika kroků do jednoho, eliminace nebo významná redukce množství rozpouštědel. Změna kvantity solventů by mohla eventuálně znamenat i nemalé snížení nákladů nutných pro analýzu. Metody pasivního vzorkování velkou většinu z těchto požadavků naplňují (Gorecki & Namieśnik., 2002).

Technologie pasivního vzorkování lze využít k monitorování organických i anorganických polutantů ve vzduchu, vodě, sedimentech, nebo v půdě (Namieśnik *et. al.*, 2005).

Se stále se zvyšujícím počtem obyvatel naší planety a se snahou navyšovat životní standart těchto lidí, neodmyslitelně roste i spotřeba nejrůznějších komodit, ať už potravin, vody, nebo fosilních paliv. Zlepšování životních podmínek často souvisí i se zvýšením spotřeby farmaceutických látek. Farmaka jsou ve své podstatě chemické látky využívané lidmi pro jejich biologickou aktivitu. Velká část těchto látek se v nepozměněné podobě dostává zpět do přírodního prostředí a v určitých případech může z environmentálního hlediska činit významné potíže (Kümmerer, 2010). Specifickou skupinu představují antibiotika, jejichž nadužívání vede ke zvýšené rezistenci patogenních bakteriálních kmenů a výskyt jejich reziduí v životním prostředí není dosud podrobně popsán, stejně tak jako jeho následky.

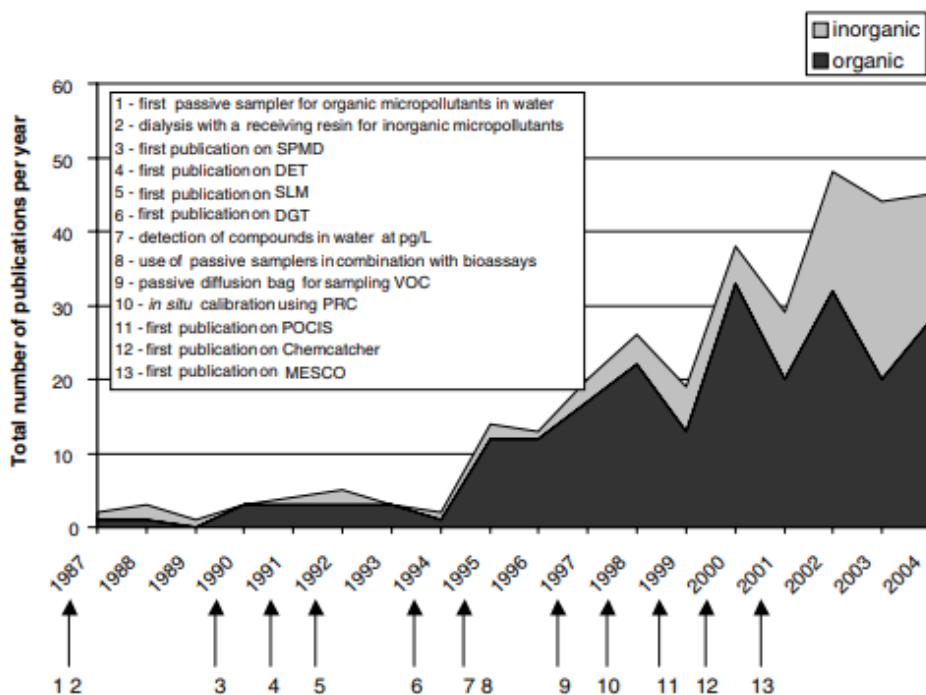
V této práci bude podrobně popsána problematika pasivního vzorkování a metod stanovení antibiotik v životním prostředí. Dále bude popsána plotnová difúzní metoda pro stanovení reziduí antibiotik, která je využívána zejména v potravinářství. Cílem experimentální části práce bude ověření možnosti propojení výhod pasivního vzorkovače a nespecifické plotnové difúzní metody pro rychlý a ekonomicky dostupný screening výskytu reziduí antibiotik v životním prostředí.

## 4 TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Pasivní vzorkování

Pasivní vzorkovače se používají už přibližně 40 let. Nejprve se jednalo o vzorkovače se zaměřením na kvalitu ovzduší (Palmer & Gunnison, 1973). První pasivní vzorkovače v souvislosti s mikropolutanty ve vodním prostředí se začali objevovat až v druhé polovině 90. let minulého století. Od té doby jejich využití a relevantnost neustále roste. Podle předchozích výzkumů, se metody pasivního vzorkování jeví jako nástroj s velkým příslibem do budoucna pro měření širokého výběru významných polutantů (Vrana *et.al*, 2005). Hlavními přednostmi pasivních vzorkovačů jsou především sběr cílových analytů *in situ*, tedy přímo na místě měření a zachycení průměrné koncentrace znečištění. Eliminuje se tak riziko nezaznamenání polutantu z důvodu výkyvu koncentrace vypouštěné znečišťující látky (tretiruka.cz, 2016). Dalšími pozitivy jsou energetická nenáročnost a signifikantní redukce nákladů potřebných na samotnou analýzu. Protože jsou data sbírána *in situ*, minimalizují se tak ztráty vzniklé dekompozicí během transportu a následného skladování, nebo během chemického obohacování vzorku (Namiešnik *et.al.*, 2005).

OBR. 1: znázorňuje mezníky ve vývoji technologie pasivních vzorkovačů a souvisejících publikací vztažených na celkové množství publikací za jednotlivé roky za posledních třicet let (Vrana *et. al*, 2005).



OBR. 1: VÝVOJ TECHNOLOGIE PV (VRANA ET. AL., 2005)

#### 4.1.1 Princip pasivního vzorkování

Podstata pasivního vzorkování leží ve volném toku molekul analytu ze zkoumaného média do média sběrného, které je ve vzorkovači. Tento tok je možný z důvodu rozdílných chemických potenciálů analytu mezi těmito dvěma médii (Gorecki & Namieśnik, 2002). Díky rozdílu chemických potenciálů, není třeba systému dodávat žádnou další vnější energii. Molekuly analytu jsou následně zachyceny v takzvané referenční fázi. Pod tímto pojmem si můžeme představit například chemické činidlo, porézní adsorbent, nebo rozpouštědlo (Vrana *et. al.*, 2005).

Podle toho jak nebo kdy dojde k ukončení vzorkování rozlišujeme dva druhy metod pasivního vzorkování. Buď se ustanoví rovnovážný stav, tento režim se nazývá rovnovážný, nebo ekvilibriální, nebo je vzorkování ukončeno operátorem, v tomto případě se jedná o takzvané kinetický neboli integrativní režim.

##### 4.1.1.1 Rovnovážné vzorkování

V rámci tohoto způsobu vzorkování jsou zařízení vystavena vnějším podmínkám po dostatečně dlouhou dobu pro ustálení rovnovážného termodynamického stavu mezi referenční fází a vodou. Tento stav je možné popsat rovnicí:

$$C_s(t) = C_w \frac{k_1}{k_2} = C_w K,$$

ve které  $C_s(t)$  je koncentrace analytu ve vzorkovači po dobu vystavení  $t$ ,  $C_w$  zastupuje koncentraci analytu ve vodném prostředí a  $k_1$ ,  $k_2$  jsou konstanty míry resorpce a desorpce. Díky rozdělovacímu koeficientu  $K$  je možné odhadnout koncentraci pozorovaného analytu. Pro stanovení koncentrace ve vzorku je také velmi důležitá znalost doby, za kterou nastala rovnováha (Vrana *et. al.*, 2005).

Za normálního stavu difundují pozorované částice přes membránu do vzorkovače, než nastane rovnovážný stav. Po poklesu koncentrace v médiu dochází k otočení směru difúze a tím pádem ke zpětnému návratu částic do média (tretiruka.cz, 2016).

Tuto metodu je možné použít při testech toxicity, nebo při určování látek v komplexních médiích. Mimo jiné se jedná o významný nástroj pro zjišťování přítomnosti a dostupnosti chemických látek v životním prostředí (Mayer *et. al.*, 2003).

Mezi často využívané zařízení, pracujících na principu rovnovážného vzorkování, patří: Gore-Sorber

Jedná se o vzorkovač skládající se z několika samostatných sběrných jednotek. Tyto jednotky obsahují sorbenty vybrané na základě jejich afinity k těkavým a semivolatilním látkám, nebo na základě jejich hydrofobních vlastností (Kot-Wasik *et. al.*, 2007). Toto zařízení pracuje s různými druhy analytů (BTEX, MTBE, PAHs, VOCs, SVOCs). Obvyklá doba expozice je 14 dní (Vrana *et. al.*, 2005).

#### PDB – Passive diffusion bag samplers

Z hlediska designu se jedná o polyethylenový vak, naplněný deionizovanou vodou. Vak se chová jako semipermeabilní membrána při zavěšení do zkoumaného vrtu. PDB vzorkování spoléhá na volný pohyb podzemní vody. Tato metoda je vhodná především na zjišťování koncentrací VOCs v podzemních vodách. VOCs difundují přes materiál difuzního vaku až do té doby, dokud nedojde k vyrovnání koncentrací s okolní vodou (Nicholas *et.al.*, 2002). Tento typ vzorkování je finančně velice nenáročný a přináší rychlé výsledky, nevýhodou je nevhodnost pro zjišťování semivolatilních sloučenin. Doba zavěšení vzorkovače se pohybuje okolo 2 týdnů (Vrana *et. al.*, 2005).

##### 4.1.1.2 Integrativní vzorkování

Tento druh vzorkování pracuje na lineárním principu. Do vzorkovače je přijímán analyt po daný časový úsek. Na rozdíl od rovnovážného vzorkování, nedochází k ustavení rovnovážného stavu. Tato metoda je vhodná i pro dlouhodobější monitoring (Kroupová, 2017).

Průměrná koncentrace látky v analytu je určována na základě znalosti rychlosti akumulace zkoumaného ve vzorkovači a množství zachycené látky v médiu za celé období expozice vzorkovače. Jelikož se jedná se o průměrnou hodnotu, nikoliv o jednorázový náhodný odběr, který by mohl být ovlivněn aktuální maximální nebo minimální koncentrací v prostředí, tak zpravidla nedochází ke chybování při hodnocení celkové koncentrace polutantů (tretiruka.cz, 2016).

Pro tato zařízení je význačná také vysoká kapacita pro sběr sledovaných kontaminantů. Díky této vysoké kapacitě je možné kontaminanty po dobu měření průběžně zakoncentrovávat (Kot-Wasik *et. al.*, 2007).

Zápis lineárního režimu tohoto způsobu vzorkování je možný pomocí rovnice:

$$C_s(t) = C_w k_1 t,$$

Tento vztah lze převést na následující rovnici:

$$M_s(t) = C_w R_s t,$$

Kde  $M_s(t)$  je množství nashromážděného analytu v referenční fázi po dobu expozice ( $t$ ).  $R_s$  představuje rychlost práce vzorkovače,  $C_w$  je časově vážený průměr (TWA) koncentrace polutantu ve vodné fázi.

Pro většinu zařízení fungujících na principu kinetického vzorkování platí, že se rychlost vzorkování příliš neliší od TWA koncentrace (Vrana *et. al.*, 2005). Abychom mohli nezaujatě stanovovat TWA koncentraci, je nutná kalibrace daného pasivního vzorkovače ještě před expozicí do terénu. Jedná se o simulaci akumulární kinetiky jednotlivých sledovaných látek v kontrolovaných laboratorních podmínkách, aby byla zachována rychlost vzorkování ( $R_s$ ). Je nutné brát v potaz fakt, že data získaná za laboratorních podmínek se mohou lišit od výsledků získaných *in situ*. V přírodním prostředí jsou vzorkovače vystaveny jiným vnějším podmínkám, jako jsou teplota, rychlost průtoku vody, biologické znečištění nebo turbulentní víření (Huckins *et. al.*, 2006).

Používání vzorkovačů na bázi integrativního vzorkování je mnohem častější než vzorkování pomocí zařízení rovnovážných. Obvyklá doba expozice se pohybuje mezi dvěma týdny a třemi měsíci (Kot-Wasik *et. al.*, 2007).

Mezi společné výhody těchto dvou metod vzorkování patří schopnost oddělení kontaminantů z epizodických událostí, které často nebývají detekovatelné během bodového měření a mohou být použity na místech kde jsou různé vodní koncentrace (Vrana *et.al.*, 2005).

Nejčastěji užívanými zařízeními na bázi kinetického vzorkování jsou:

#### SPMD – Semi-Permeable Membrane Device

Toto zařízení pracuje na principu semi-permeabilní neboli polopropustné membrány. Skládá z tenkostěnné trubice (50–100  $\mu\text{m}$ ) vyrobené z nízko-hustotního polyethylenu (LDPE). Uvnitř této trubice se nachází zpravidla neutrální, vysokomolekulární (>600 Da) lipid, například triolein.

Díky neporézní membráně je umožněn transport nepolárních chemických látek k výše zmíněnému lipidu, tam se také koncentrují (Huckins & Lebo, 2002). LDPE trubice napodobuje

funkci biologické membrány se schopností selektivní difuze organických sloučenin (Namiešnik *et. al.*, 2005).

Hlavním smyslem SPMD vzorkovačů je zjišťování lipidických nebo v tucích rozpustných (nepolárních nebo hydrofobních) semivolatilních organických látek ve vodním prostředí a ve vzduchu (Huckins & Lebo, 2002). Ve srovnání s ostatními vzorkovači se jeví jako nejeftivnější akumulátor lipofilních látek (Namiešnik *et. al.*, 2005).

Doba expozice se pohybuje v rozmezí několika dnů až několika měsíců, nejběžněji se však udává doba jednoho měsíce (Huckins & Lebo, 2002).

### POCIS – Polar Organic Chemical Integrative Sampler

Vzorkovač typu POCIS se skládá z pevného sorbentu, uzavřeného mezi dvěma mikroporézními polyethersulfonovými membránami. Tyto membrány umožňují průchod vody a rozpuštěných chemických látek až k sorbentu, kde jsou tyto chemikálie zachyceny. Membrány jsou mimo jiné odolné vůči biologickému znečištění, což může znamenat snížení množství zkoumaných chemikálií (Alvarez & Huckins, 2004).

Technologie POCIS vzorkování se specializuje na záchyt polárních nebo hydrofilních organických látek. Mezi hlavní kontaminanty patří polární pesticidy (Assoumani *et. al.*, 2014), herbicidy, farmaceutické látky, antibiotika, steroidy, hormony nebo produkty osobní péče (Vrana *et. al.*, 2005).

Sorbenty zachytávající částice se mohou lišit podle druhu kontaminantů. Obecně jsou uznávány 2 druhy konfigurací:

- I. *Obecná konfigurace* je typická kombinací tří pevných sorbentních materiálů a je nejčastěji používaná pro pesticidy, hormony a chemické látky spojené s odpadní vodou a jinými organickými polutanty (Alvarez & Huckins, 2004).
- II. *Farmaceutická konfigurace* obsahuje pouze jeden pevný sorbent. Specializuje se na rezidua léčiv (Vrana *et. al.*, 2005).

Pro maximalizaci výnosu a zaznamenání více druhů kontaminantů se často používají různé kombinace konfigurací (Alvarez, & Huckins, 2004). Obvyklá doba expozice je až 2 měsíce (Vrana *et. al.*, 2005).

## Chemcatcher

Chemcatcher vzorkovače používají difuzi limitující membrány a pevno-vazebnou přijímací fázi. Tyto dvě součásti jsou společně uzavřeny do pouzdra z inertního plastu. Pro různé typy polutantů jsou dostupné různé kombinace druhů přijímacích fází.

Pomocí těchto zařízení dochází k detekci polárních nebo nepochárních organických látek, několika trvalých organických kontaminantů (POPs = Persistent Organic Pollutants), Organochlorových pesticidů, PCBs (Polychlorinated biphenyls = Polychlorované bifenylly), PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons = Polycyklické aromatické uhlovodíky) (Kot-Wasik, *et. al.*, 2007).

Toto zařízení je do přírodního prostředí nasazováno na dva týdny až jeden měsíc (Vrana *et. al.*, 2005).

## Keramický dozimetr

Keramické dozimetry pracují na principu akumulace kontaminantů difuzí z okolní vody na adsorbční lůžko. Polutanty se hromadí s časem, v závislosti na koncentračním gradientu a efektivním koeficientu přenosu hmoty přes membránu, tento koeficient je definován jako podíl koeficientu difuze a difuzní vzdálenosti.

Jako membrány jsou používány porézní keramické materiály, které velmi dobře kontrolují tok částic. Jedná se o vcelku dostupný a spolehlivý materiál a velkým potenciálem do budoucna. Další výhodou je jejich inertnost a schopnost nepřijímat organické soluty, které by mohly zpomalovat příjem žádoucích látek (Martin *et. al.*, 2001).

Tento druh dozimetrů se používá na zkoumání PAHs, BTEX (benzen, toluen, ethylbenzen, xylén), chlorovaných uhlovodíků. Jsou používány na monitoring podpovrchových vod, řek, jezer a kanalizací odpadních vod. Doba nasazení se pohybuje okolo jednoho roku (Vrana *et. al.*, 2005).

## PISCES – Passive In Situ Concentration Extraction Sampler

PISCES vzorkovače se skládají z rezervoáru rozpouštědla o objemu přibližně 200 ml. Tento rezervoár je vyrobený z mosazné trubice, těsnění a membrány. Jako náplň se používá hexan.

Když je vzorkovač ponořen do vody, rozpuštěné hydrofobní sloučeniny jako PCBs, a DDTs (Dichloro-diphenyl-trichloroethanes = dichlor-difenyl-trichlorethany) prochází přes membránu a akumulují se v nepolárním rezervoáru hexanu (Loganathan *et. al.*, 2003).

Použití je nejčastější při zkoumání obsahu povrchových vod a odpadních výtoků. Obvyklá doba monitoringu je dva týdny (Vrana *et. al.*, 2005).

#### MESCO – Membrane-Enclosed Sorptive Coating

Tento druh zařízení funguje na podobném principu jako SPMD, ale používá míchací tyčku obalenou PDMS (=Poly(dimethylsiloxany)), nebo silikonovým polymerem. Jako celek je dohromady uzavřen v dialyzačním membránovém vaku. Tento vak slouží jako přijímací fáze.

Ačkoli se tento vzorkovač používá na malých rozlohách a s poměrně malým objemem vzorku, jeho citlivost pro polutanty je srovnatelná s ostatními pasivními vzorkovači. (Vrana *et. al.*, 2005; Chimuka *et. al.*, 2008). Především se využívá při monitoringu koncentrací PAHs, PCBs a organochlorových pesticidů. Do terénu se umisťují na cca dva týdny (Vrana *et. al.*, 2005).

#### SLMD – Stabilized Liquid-Membrane Device

Tyto vzorkovače se skládají z proužků vrstevnaté hadice z nízko-hustotního polyethylenu (LDPE). Tato trubice obsahuje 1 ml směsi kyseliny olejové a EMO-8Q (7-[4-ethyl-1-methyloctyl] -8-quinolinol). Reakční směs průběžně difunduje na vnější povrch LDPE membrány a poskytuje tak sekvestraci několika divalentních kovů (Brumbaugh *et. al.*, 2002).

Touto metodou se pozorují ionty kadmia (Cd), kobaltu (Co), mědi (Cu), niklu (Ni), olova (Pb), a zinku (Zn) v přírodních vodách. Vzorkovače zůstávají na lokalitě v rámci dnů až týdnů (Vrana *et. al.*, 2005).



## 4.2 Farmaceutické látky v životním prostředí

Farmaceutické látky jsou chemické substance, využívané na diagnózu, léčbu, zmírnění nebo modifikaci jak lidských, tak zvířecích nemocí (Daughton & Ternes, 1999). Jedná se o hlavní nástroj západní medicíny. Ročně jsou vyprodukovány a zkonsumovány stovky tun farmak. Velké množství těchto látek a jejich metabolitů si nachází cestu do přírodního prostředí, na které mají často negativní vliv (Sherer, 2006).

Nejčastěji se vyskytujícími farmaky ve vodním prostředí jsou látky s analgetickými účinky, protizánětlivá léčiva, antibiotika, anti-epileptika, látky regulující hladinu tuku v krvi, beta-blokátory, některá kontrastní media a orálně podávaná antikoncepce. Dostávají se tam zejména nekvalitní funkcí ČOV, průsakům ze skládek nebo kontaminací půd (Heberer, 2002).

Tato BP se bude zabývat detailněji problematikou antibiotik.

### 4.2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky přírodní, nebo uměle vytvořené člověkem působící proti mikroorganismům, jako jsou bakterie, houby nebo protozoa, a jejich množení (Kümmerer, 2009). Díky včasnému a správnému podání antibiotik dochází každý den k záchraně velkého množství životů. S jejich čím dál častějším využíváním bohužel také narůstá množství bakteriálních patogenů rezistentních k těmto sloučeninám.

#### ***Zdroje antibiotik v přírodě***

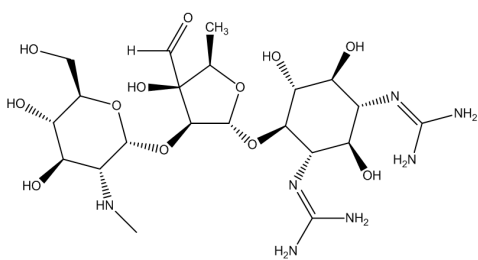
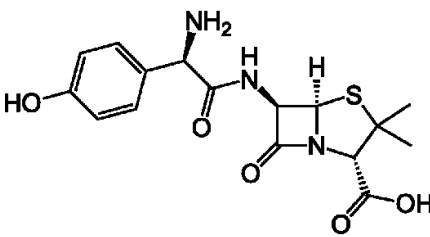
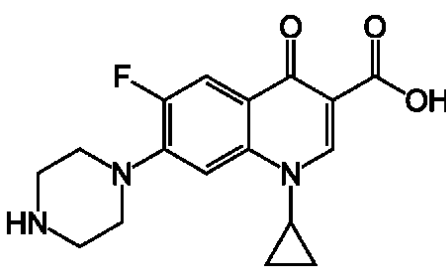
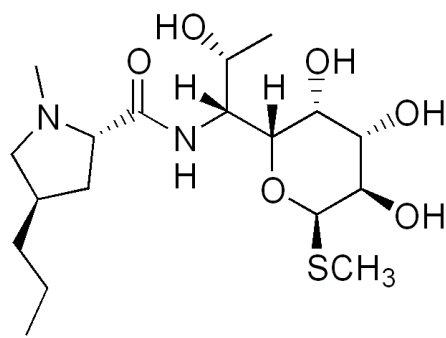
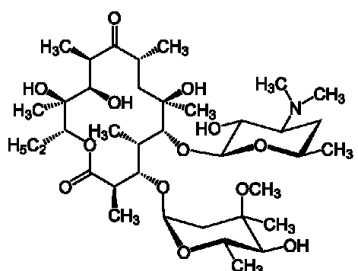
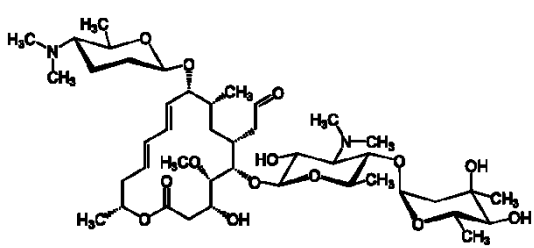
Některé druhy antibiotik, jako  $\beta$ -laktamy, streptomyciny, aminoglykosidy se dostávají do prostředí naprosto přírodní cestou, jsou totiž produkovány půdními bakteriemi jako je rod *Streptomyces* (Kümmerer, 2009).

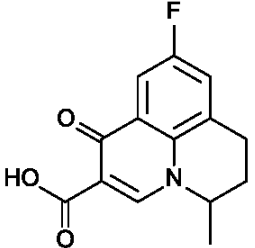
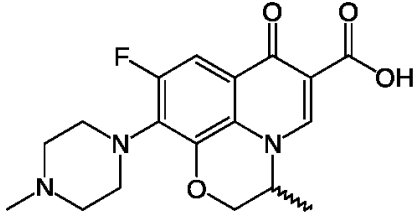
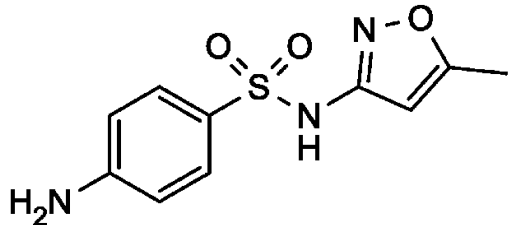
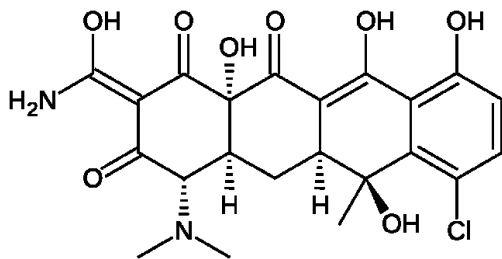
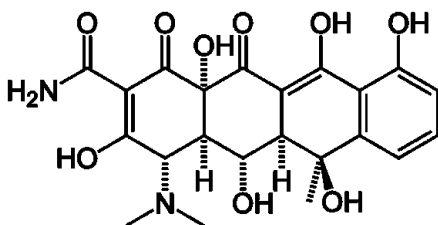
Významným zdrojem je také samotná produkce těchto látek, zejména v rozvinutých zemích. Velká množství antibiotik jsou používána v akvakultuře, pro prevenci nebo léčbu infekčních onemocnění. Dalšími původci jsou chovatelé většího množství užitkových zvířat, kteří je využívají především pro podporu růstu zvířat (Landers *et. al*, 2012).

Největším původcem antibiotik je medicína, v praxi je zde použito 50-70 % z celkového množství používaných antibiotik. Nejčastěji jsou zastoupeny  $\beta$ -laktamy zahrnující podskupiny penicilinů, cephalosporinů a karbapenemů. Tato data se samozřejmě mohou mírně lišit v závislosti na geografickém umístění (Kümmerer, 2009).

## Nejběžnější druhy antibiotik ve vodním prostředí

Tab. 1: přehled nejběžnějších antibiotik ve vodním prostředí

<p><b>Třída: Aminoglykosidy</b></p> <p><b>Antibiotikum: Streptomycin</b></p>  <p><b>Vzorec:</b> <math>C_{21}H_{39}N_7O_{12}</math></p> <p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy proteinů</p> <p><b>Molární hmotnost:</b> 581,574 g/mol</p>	<p><b>Třída: <math>\beta</math> – laktamy</b></p> <p><b>Antibiotikum: Amoxicilin</b></p>  <p><b>Vzorec:</b> <math>C_{16}H_{19}N_3O_5S</math></p> <p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy BS</p> <p><b>Molární hmotnost:</b> 365,4 g/mol</p>
<p><b>Třída: Fluoroquinolony</b></p> <p><b>Antibiotikum: Ciprofloxacin</b></p>  <p><b>Vzorec:</b> <math>C_{17}H_{18}FN_3O_3</math></p> <p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy DNA a replikace</p> <p><b>Molární hmotnost:</b> 331.346 g/mol</p>	<p><b>Třída: Linkosamidy</b></p> <p><b>Antibiotikum: Lincomycin</b></p>  <p><b>Vzorec:</b> <math>C_{18}H_{34}N_2O_6S</math></p> <p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy proteinů</p> <p><b>Molární hmotnost:</b> 406.538 g/mol</p>
<p><b>Třída: Makrolidy</b></p> <p><b>Antibiotikum: Erythromycin</b></p>  <p><b>Vzorec:</b> <math>C_{37}H_{67}NO_{13}</math></p> <p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy DNA a replikace</p> <p><b>Molární hmotnost:</b> 733.94 g/mol</p>	<p><b>Třída: Makrolidy</b></p> <p><b>Antibiotikum: Spiramycin</b></p>  <p><b>Vzorec:</b> <math>C_{43}H_{74}N_2O_{14}</math></p> <p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy DNA a replikace</p> <p><b>Molární hmotnost:</b> 843.053 g/mol</p>

<p><b>Třída: <i>Quinolony</i></b>  <b>Antibiotikum: <i>Flumequin</i></b></p>	<p><b>Třída: <i>Quinolony</i></b>  <b>Antibiotikum: <i>Ofloxacin</i></b></p>
	
<p><b>Vzorec:</b> C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub></p>	<p><b>Vzorec:</b> C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub></p>
<p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy DNA a replikace</p>	<p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy DNA a replikace</p>
<p><b>Molární hmotnost:</b> 261.25 g/mol</p>	<p><b>Molární hmotnost:</b> 361.368 g/mol</p>
<p><b>Třída: <i>Sulfonamidy</i></b>  <b>Antibiotikum: <i>Sulfamethoxazol</i></b></p>	<p><b>Třída: <i>Tetracykliny</i></b>  <b>Antibiotikum: <i>Chlortetracyklin</i></b></p>
	
<p><b>Vzorec:</b> C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S</p>	<p><b>Vzorec:</b> C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub></p>
<p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy kyseliny folinové, tudíž i DNA</p>	<p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy proteinů</p>
<p><b>Molární hmotnost:</b> 253.279 g/mol</p>	<p><b>Molární hmotnost:</b> 478.882 g/mol</p>
<p><b>Třída: <i>Tetracykliny</i></b>  <b>Antibiotikum: <i>Oxytetracyklin</i></b></p>	
	
<p><b>Vzorec:</b> C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub></p>	
<p><b>Hlavní funkce:</b> inhibice syntézy proteinů</p>	
<p><b>Molární hmotnost:</b> 460.434 g/mol</p>	

### Streptomycin

Streptomycin je antibiotikum produkované půdní aktinomycetou *Streptomyces griseus*. Má široké spektrum využití, ale nejčastěji se využívá při léčbě tuberkulózy (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2018). Streptomycin se také ve velké míře používá pro podporu růstu ovoce v USA (Kümmerer, 2009). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) se pohybuje okolo 360 až 500 µg/ml a minimální baktericidní koncentrace (MBC) je přibližně 500 µg/ml (Popowska *et. al.*, 2010).

### Amoxicilin

Jedná se o látku ze skupiny penicilinů a nejčastěji léčené jsou infekce středního ucha, dýchacích a močových cest, infekční onemocnění kůže, kostí nebo kloubů (sukl.cz, 2016). Mimo jiné se také používá jako podpora růstu domácích a užitkových zvířat. Tato látka se do prostředí dostává v nezměněné podobě a v poměrně velkém množství, proto bylo možné naměřit koncentrace v různých typech vodních těles. V odpadních vodách z ČOV byla zaznamenána koncentrace pohybující se mezi 1,80 – 120,35 ng/l, v povrchových vodách 39–245 ng/l. největší koncentrace byly pozorovány v odpadních vodách z nemocnic, kde se koncentrace pohybovaly až kolem 900 ng/l, a měst kdy koncentrace dosáhla na 1670 ng/l (Elizalde-Velázquez *et. al.*, 2016).

### Ciprofloxacin

Toto antibiotikum je předepisováno na infekce močových a dýchacích cest, především na zápal plic, zánět tenkého a tlustého střeva, kostí kůže nebo kloubů (sukl.cz, 2011). Odhadované koncentrace jsou 579 mg/m<sup>3</sup> pro odpadní vody z nemocnic, 6,06 mg/m<sup>3</sup> v odpadních vodách z měst, 2,59 mg/m<sup>3</sup> pro vodu vytékající z ČOV, 3,48 mg/m<sup>3</sup> pro čistírenský kal, v půdě je odhadována koncentrace 0,006 mg/m<sup>3</sup> a v mořském prostředí 0,15 mg/m<sup>3</sup> (Harris *et. al.*, 2013). V povrchové vodě byla naměřena koncentrace 0,03 µg/l (Kolpin *et. al.*, 2002).

### Lincomycin

Linkomycin je látka produkovaná bakterií *Streptomyces lincolnensis* a je běžně užívána na léčbu streptokokových a stafylokokových infekcí, nebo nemocí způsobených *Bacteroides fragilis* (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2018). Koncentrace tohoto antibiotika v povrchových vodách může dosahovat až 0,73 µg/l (Kolpin *et. al.*, 2002).

### Erythromycin

Tato sloučenina je využívána na léčbu respiračních nemocí jako je zánět průdušek, zápal plic, legionářská nemoc nebo černý kašel. Je to účinné léčivo proti záškrtu a některým pohlavně přenosným nemocím, mezi které patří například syfilis. Je možné tuto látku používat jako prevenci revmatické horečky (medlineplus.gov, 2017). Erythromycin byl zaznamenán v efluentu z ČOV s koncentrací od 0-27000 ng/l, v povrchové sladké vodě s koncentrací od 0-75000 ng/l. Tato látka byla detekována i v pitné vodě s koncentrací 0-136 ng/l. Erythromycin je možné najít i v mořském prostředí kde se jeho koncentrace pohybují mezi 0-1900 ng/l, ale i v čistírenských kalech s koncentrací od 0 do méně než 1037 µg/kg (Schafhauser & Fleckenstein, 2018).

### Spiramycin

Jednou z nejvýznamnějších funkcí tohoto antibiotika je zabraňování přenosu parazita *Toxoplasma gondii* z matky na plod během těhotenství (Kuhlmann, 2017). Dále je účinné proti gram-pozitivním patogenům a stafylokokům (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2018). V efluentu ČOV bylo antibiotikum detekováno o koncentraci přibližně 75 ng/l a v říčních prostředí o koncentracích až 74,2 ng/l (Zuccato *et. al.*, 2005).

### Flumequin

Flumequin se vyznačuje schopností boje jak s gram-pozitivními tak i s gram-negativními bakteriemi. V minulosti se ve veterinární medicíně používal na léčbu střevních infekcí různých druhů zvířat. V současné době je toto antibiotikum staženo z trhu (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2018). Přítomnost této sloučeniny byla detekována v říčních systémech s průměrnou koncentrací 11-18 ng/l (Tamtam *et. al.*, 2008).

### Ofloxacin

Toto antibiotikum je předepisováno na léčbu očních a ušních bakteriálních infekcí, jedná se například o záněty rohovky, spojivek, ječné zrna, infekční zánět zevního zvukovodu nebo chronický hnisavý zánět středního ucha (sukl.cz, 2016). V povrchové vodě byla zjištěna koncentrace 135,1 ng/l (Tong *et. al.*, 2014). Ve výtoku z ČOV byla detekována koncentrace až 82 ng/l (Kümmerer, 2009).

### Sulfamethoxazol

Toto léčivo zabírá na infekce horních i dolních cest dýchacích, na pneumonii způsobenou *Pneumocystis jirovecii*, infekční nemoci ústní, nosní a krční dutiny, nebo infekce vylučovacího ústrojí (sukl.cz, 2010).

V odpadní vodě z ČOV byla naměřena koncentrace 520 ng/l (Kolpin *et. al.*, 2002). V podzemní vodě byla zaznamenána koncentrace 170 ng/l (Fram & Belitz, 2011). V nemocničním efluentu byla detekována koncentrace 278 ng/l (Martins *et. al.*, 2011).

#### Chlortetracyklin

Tato látka se běžně předepisuje jako mast na oční infekce (drugs.cz, 2018). V efluentní vodě z ČOV byla naměřena koncentrace až 690 ng/l (Kolpin *et. al.*, 2002), koncentrace v povrchových vodách byla naměřena 122,3 ng/l. Pro podzemní vody byla naměřena koncentrace 86,6 ng/l (Tong *et. al.*, 2014).

#### Oxytetracyklin

Oxytetracyklin je antibiotikum podávané skotu jako účinný lék proti bovinní mastitidě. Používá se také jako rostlinný hormon na podporu růstu rostlin (Szekely & Didaskalou, 2016). Byla zjištěna koncentrace v povrchových vodách, která se pohybuje okolo 32 ng/l (Daghrir & Drogui, 2013).

##### 4.2.1.1 Metody stanovení přítomnosti antibiotik

Protože těchto látek stále v přírodním prostředí přibývá, je potřeba sledovat jejich osudy a koncentrace. Během minulých let bylo vyvinuto několik účinných metod vhodných pro detekci farmaceutických látek v prostředí.

Mezi tyto metody patří SPE (Solid Phase Extraction), HPLC/MS (High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry), GC (Gas Chromatography), RP-LC (Reversed Phase-Liquid Chromatography) v kombinaci s ESI (Electrospray ionization) a metoda plotnové difuze.

#### Plotnová difuzní metoda

Tato metoda je hojně využívána pro měření minimální inhibiční koncentrace látek v tuhém médiu. Principem je aplikace roztoků antibiotik o různých koncentracích do jamek na Petriho misce s živným médiem, které bylo naočkováno určitým druhem bakteriálního patogenu. Po kultivaci (20-24 hodin) je sledována inhibiční zóna bez bakteriálního porostu, vytvořená kolem jamek s roztoky antibiotik (Bonev *et. al.*, 2008). Běžně se využívá v potravinářství při detekci reziduí antibiotik v živočišných produktech (Cháfer-Pericás *et. al.*, 2010). Tento postup lze využít také jako kvantifikátor antibakteriálních účinků některých léčebných rostlin (Noor Rain *et. al.*, 2005).

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této části mé práce byla experimentálně ověřena možnost spojení výhod integrativního pasivního vzorkování s plotnovou difúzní metodou pro stanovení antibakteriální aktivity u přečištěné vody z ČOV. Výsledná metoda by v případě pozitivního výsledku znamenala jednoduchý a poměrně nízkonákladový způsob detekce reziduí antibiotik v životním prostředí.

### 5.1 Použitý materiál a přístroje

#### 5.1.1 Materiál a chemikálie

Suspenze spór <i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	Merck, USA
DEV nutrient agar	Merck, USA
Methanol pro HPLC $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Aktivní uhlí Aquasorb 2000, 8x16 mesh	Jacobi, Švédsko
Antibiotikum Ospan (phenoxymethylpenicillinum)	Sandoz, ČR

#### 5.1.2 Přístroje

Analytické váhy KERN EWB 620 - 2M	Kern&Sohn, Německo
Ultrazvuková vana K-2L	Kraintek, ČR
Vortex mixer WIZARD advanced IR	Scientifica, Itálie
Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) typ PHARMACEUTICAL	Labicom, ČR

### 5.2 Umístění vzorkovačů

Pasivní vzorkovače typu POCIS byly umístěny do odtokové strouhy pro přečištěnou odpadní vodu v areálu čistírny odpadních vod (ČOV) v Horních Beřkovicích (OBR. 2 a 3). V této ČOV je, mimo jiné, čištěna odpadní voda z areálu Psychiatrické léčebny Horní Beřkovice, dala se tedy předpokládat vysoká pravděpodobnost výskytu větší a souvislé koncentrace farmak, včetně antibiotik, v přečištěné odpadní vodě.

Celkem 6 vzorkovačů POCIS bylo v odtokové strouze zavěšeno po dobu 2 měsíců, v období listopad 2017 až leden 2018. Z této doby pocházejí analýzy obsahu jednotlivých antibiotik uvedené v Tab. 2.

Pasivní vzorkovač po dvouměsíční expozici je zobrazený na OBR.4. Většina použitých pasivních vzorkovačů však byla po ukončení 2 měsíců bohužel nalezena vně strouhy nevratně poškozena (přestože se odtoková strouha nacházela v uzavřeném areálu ČOV). Z tohoto důvodu byly zkonstruovány provizorní vzorkovače z nerezových sítěk na přípravu čaje. Sítko bylo zároveň použito k prosetí aktivního uhlí (AU). Frakce, která neprošla sítím, byla dále použita jako provizorní náplň vzorkovače. Do každého sítka bylo odváženo 8 g AU. Tyto vzorkovače byly umístěny na lokalitě po dobu 2 měsíců v období březen-květen 2017. Vyzvednuty byly dne 2.5.2018 (viz. OBR.5).

Tab. 2: Koncentrace antibiotik v ČOV Horní Beřkovice (Data poskytnuta firmou Dekonta a. s.)

Antibiotikum	Koncentrace při vstupu do ČOV (ng/l)	Koncentrace při výstupu z ČOV (ng/l)	Koncentrace v recipientu-potok
Chloramphenicol	77,0	60,0	nd
Clarithromycin	3800,0	290,0	220,0
Azitromycin	320,0	200,0	95,0
Norfloxacin	970,0	180,0	-
Ciprofloxacin	1300,0	540,0	-
Ofloxacin	460,0	530,0	-
Doxycyclin	220,0	130,0	-



OBR. 2: AREÁL ČOV HORNÍ BEŘKOVICE A



OBR. 3: AREÁL ČOV HORNÍ BEŘKOVICE B





OBR. 4: PASIVNÍ VZORKOVAČ POCIS



OBR. 5: NEREZOVÁ SÍTKA

### 5.3 Optimalizace metody stanovování – popis a průběžné výsledky

Vzhledem k použití sorbentu jako náplně pasivních vzorkovačů (Oasis HLB v případě vzorkovače POCIS a AU v případě provizorního vzorkovače) byly před samotnou analýzou po dvouměsíční expozici provedeny testy zaměřené na zmobilitnění sorbovaných inhibičních látek. Pro tyto testy bylo použito antibiotikum Oспен s účinnou látkou phenoxymethylpenicillinum (150 IU/ml) v ředění  $1:10^3$ ,  $1:10^6$ ,  $1:10^9$  (ATB: destilovaná voda). Poté bylo z každého roztoku odebráno 10 ml, tyto vzorky byly nality na připravenou buničinu a aktivní uhlí, pokaždé ve dvou paralelách. Následovala sterilizace v tlakovém hrnci, která trvala cca 10 minut.

Pro přípravu živného media bylo naváženo 10,7g DEV nutrient agaru a rozmícháno v Erlenmeyerově baňce s 250 ml destilované vody. Ta byla po překrytí alobalem sterilizována opět v tlakovém hrnci po dobu 20 minut.

Po této době byla rozpuštěná směs v baňce zchlazena na teplotu přibližně  $50^{\circ}\text{C}$  a vzápětí do ní byla přidána suspenze spór *Bacillus subtilis*. Po promíchání celého obsahu baňky bylo toto médium nalito na Petriho misky. Množství agaru vyšlo na 8-9 misek naplněných do poloviny. Po ztuhnutí agaru do něj byly pomocí sterilní zkumavky vyraženy jamky o průměru cca 1 cm.

Po sterilizaci a zchladnutí byly vzorky buničiny a uhlí s roztoky antibiotik přeneseny do připravených jamek na Petriho miskách s DEV agarem obohaceným o suspenzi *Bacillus subtilis*. Takto připravené vzorky byly kultivovány přibližně 20 hodin při laboratorní teplotě.

Po uplynutí kultivační doby byly kontrolovány výsledky experimentu, tak, že byla měřena velikost čiré zóny kolem jednotlivých jamek. Tato zóna vznikla inhibičními vlastnostmi antibiotik, zatímco zbytek povrchu misky byl kolonizován kmenem *Bacillus subtilis*. Tímto měřením byla pro další pokusy vyselektována koncentrace  $1:10^3$ , která vykazovala optimální velikost zón jak na buničině, tak u aktivního uhlí, přičemž zóna v jamce s AU byla viditelně zmenšená při použití stejného množství roztoku ATB, jako v případě jamky s buničinou. U větších ředění na aktivním uhlí nebyla žádná zóna pozorována.



**OBR. 6: ZÓNY VYTVOŘENÉ PŘI ŘEDĚNÍ 1:1000**

#### 5.3.1 Extrakce methanolem

Extrakční krok předúpravy sorbentu byl testován za účelem opětného zvětšení hodnocené zóny pro zvýšení detekční schopnosti metody. 0,5g AU s 0,5ml roztoku antibiotika ( $1:1000$  v/v) bylo přeneseno do zkumavky, do které bylo následně přidáno 5 ml  $\geq 99,9$  % methanolu. Zkumavka byla protřepána na Vortexovém mixéru po dobu 2 minut, následně byla automatickou pipetou odebrána kapalná fáze do jiné označené zkumavky. Do zkumavky s aktivním uhlím bylo přidáno dalších 5 ml methanolu. Tento postup byl opakován celkem třikrát. Po spojení všech tří extraktů byl obsah zkumavky s methanolvým extraktem vysušený pod proudem dusíku. Po vysušení do sucha byl odparek rozpuštěn v 0,5 ml deionizované vody a aplikován do jamky v agarové plotně naplněné buničinou. Jako pozitivní a negativní kontrola sloužily jamky naplněné 0,5 g AU s 0,5ml stejného roztoku ATB a buničinou s deionizovanou vodou. Každá varianta byla provedena ve třech opakováních. Po 20 h inkubace byla odečtena velikost zón.

Extrakce tímto způsobem se ukázala jako neúčinná, protože se kolem jamek s extrakty nevytvořila žádná zóna. Pouze v případě jedné paralely vznikla zóna o průměru 5 mm, což odpovídalo velikosti zóny původní jamky s AU (zobrazené na OBR.6). Pokus byl poté zopakován ještě jednou s tím rozdílem, že místo vortexového mixéru byla použita ultrazvuková lázeň. Postup byl stejný, do kádinky s aktivním uhlím napuštěným roztokem antibiotika bylo

přidáno 5 ml methanolu. Tento pokus byl prováděn v 6 paralelách. Kádinky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 15 minut. Poté byl slit extrakt a přidáno nových 5 ml methanolu. Tato extrakce byla provedena třikrát.

Po vysušení vzorků pod proudem dusíku byly 3 odparky rozpuštěny v 1 ml destilované vody, další 3 byly rozpuštěny v roztoku 0,1 ml methanolu následně zředěném 0,9 ml destilované vody. Všechny vzorky byly vneseny do jamek s buničinou. Bohužel ani tímto způsobem extrakce se nedocílilo zmobilnění antibiotika za účelem lepší detekce. Je tedy možné, že antibiotikum použité v pokusu je velmi citlivé na použitou extrakční proceduru, i když byla cíleně zvolena, metoda co nejšetrnější.

Tato extrakce byla provedena i ve větším měřítku, kdy k 5 g aktivního uhlí bylo přidáno 5 ml roztoku s antibiotikem a následně se extrahovalo 10 ml methanolu. Výsledný odparek byl opět rozpuštěn v 1 ml vody. Ani tato verze nepřinesla uspokojivé výsledky.

Po negativním přínosu extrakčního kroku, bylo rozhodnuto náplně pasívních vzorkovačů z lokality aplikovat do jamek přímo bez předchozí extrakce.

#### 5.4 Reálné vzorky z lokality

Náplně improvizovaných vzorkovačů, v podobě 4 nerezových sítěk, obsahovaly velké množství organické hmoty, pravděpodobně kvůli příliš velkým pórům. Bylo tedy nutné živočišnou část hmoty stabilizovat. Stabilizace byla provedena umístěním vzorků do sušící pece při teplotě 85°C na 2 minuty. Následovalo plnění jamek na Petriho miskách.

Při odečítání výsledků ze vzorků vyšlo najevo, že tato metoda za stávajících podmínek není efektivní. Zóny se nikde nevytvořily.

Druhým použitým zařízením byl vzorkovač POCIS typu PHARMACEUTICAL, který se skládal ze dvou porézních membrán, vložených do ocelových rámečků, které k sobě byly napevno přišroubované. Po rozšroubování a vyjmutí membrán ze vzorkovače, byl opatrně přenesen mezimembránový obsah do připravených jamek v DEV agaru s *Bacillus subtilis*.

Při hodnocení těchto vzorků byl zaznamenán náznak inhibiční zóny antibiotika u jedné z jamek.

## 6 Diskuze a závěr

Podle průzkumu dosavadní literatury lze očekávat soustavný nárůst zájmu o metody pasivního vzorkování. Jedná se o velmi perspektivní odvětví vědy. Stále je tlak na vývoj nových technologií a zdokonalování typů pasivních vzorkovačů už existujících, které budou posouvat environmentální vědy dopředu. Jak bylo zmíněno výše velikost lidské populace stále roste a nepředpokládá se omezování spotřeby antibiotik, právě naopak. Cesta tudíž bude muset vézt přes zlepšování metod screeningu životního prostředí a samozřejmě mnohem efektivnější degradaci reziduí antibiotik čističkách odpadních vod.

Během experimentu bohužel nedošlo k ověření využitelnosti výhod pasivního vzorkování v kombinaci s plotnovou difuzní metodou, to neznamená, že po určitých modifikacích metodiky by nebylo možné dojít k lepším výsledkům. Možností by bylo do provizorních vzorkovačů vložit membránu z tenké tkaniny, aby se zamezilo přístupu živočichů k sorbentu, potom by se vzorky nemusely stabilizovat v sušící peci a vystavovat je tak vysokým teplotám. Způsobem, jak potenciálně zlepšit výsledek by mohlo být úplné vyřazení zmobilitní ATB pomocí extrakce sorbentu z postupu. Tato metoda se ukázala být neefektivní, byl takto prokázán negativní vliv na měřený parametr – inhibici růstu kmene *B. subtilis*. Aktivní uhlí zřejmě také není ideálním sorbentem pro integrativní vzorkování ATB, důvodem může být mimo jiné neselektivní záchyt všech přítomných polutantů. Množství sledovaných ATB je pak po dvou měsících pokusu tak nízké, že není touto metodou detekovatelné. Další možností je fakt, že by se ve vzorcích z druhé fáze pokusů (analýzy z konce roku 2017) nevyskytovala žádná antibiotika. Tato možnost je ale velmi nepravděpodobná, protože podle dostupných informací od firmy Dekonta a.s., zde byla antibiotika předepisována kontinuálně. Na druhou stranu kumulativní koncentrace ATB mohla být ve sledovaném období natolik malá, že nebyla použitou metodou detekovatelná.

Jako jedno možné řešení pro budoucí testování se jeví použití selektivního sorbentu vzorkovačů POCIS a pro naplnění jamky použít jeho větší množství. V tomto případě je nutné vzít v úvahu vysokou cenu vzorkovačů a nebezpečí poškození nebo odcizení vandaly při dlouhodobější expozici v terénu. Ideálním řešením by byla kombinace vhodného sorbentu s nerezovým sítkem. Tímto krokem by se snížily případné ztráty vzniklé poškozením nebo odcizením.

## 7 Seznam použité literatury

Alvarez, D. and Huckins, J. (2004) 'Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS)', *USGS science for a changing world*. Available at: <https://www.cerc.usgs.gov/pubs/center/pdffdocs/pocis.pdf> (Accessed: 7 May 2018).

Assoumani, A. *et al.* (2014) 'Use of passive stir bar sorptive extraction as a simple integrative sampling technique of pesticides in freshwaters: Determination of sampling rates and lag-phases', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1333, pp. 1–8.

Bonev, B., Hooper, J. and Parisot, J. (2008) 'Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 61(6), pp. 1295–1301.

Brumbaugh, W. G. *et al.* (2002) 'Stabilized liquid membrane device (SLMD) for the passive, integrative sampling of labile metals in water', *Water, Air, and Soil Pollution*, 133(1–4), pp. 109–119.

Daghrir, R. and Drogui, P. (2013) 'Tetracycline antibiotics in the environment: a review', *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), pp. 209–227.

Daughton, C. G. and Ternes, T. A. (1999) 'Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?', *Environmental health perspectives*. National Institute of Environmental Health Science, 107 Suppl 6(Suppl 6), pp. 907–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592150> (Accessed: 30 April 2018).

Elizalde-Velázquez, A. *et al.* (2016) 'Amoxicillin in the Aquatic Environment, Its Fate and Environmental Risk', in *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*. InTech.

- Fram, M. S. and Belitz, K. (2011) 'Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California', *Science of The Total Environment*. Elsevier, 409(18), pp. 3409–3417.
- Górecki, T. and Namieśnik, J. (2002) 'Passive sampling', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 21(4), pp. 276–291.
- Harris, S. *et al.* (2013) 'Simulation model to predict the fate of ciprofloxacin in the environment after wastewater treatment', *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(7), pp. 675–685.
- Heberer, T. (2002) 'Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data', *Toxicology Letters*. Elsevier, 131(1–2), pp. 5–17.
- Huckins, J. N. and Lebo, J. D. (2002) 'Semipermeable Membrane Device (SPMD)G. Overview a thorough cleaning to remove any potential and Comparison of Lipid-Containing Semipermeable Description and Application', *Environ. Sci. Technol*, 26, pp. 85–91. Available at: <https://www.cerc.usgs.gov/pubs/center/pdfdocs/spmd.pdf> (Accessed: 27 April 2018).
- Huckins, J. N., Petty, J. D. and Booij, K. (2006) *Monitors of organic chemicals in the environment : semipermeable membrane devices*. Springer.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á. and Puchades, R. (2010) 'Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 29(9), pp. 1038–1049.
- Chimuka, L., Cukrowska, E. and Tutu, H. (2008) 'Monitoring of Aquatic Environments

Using Passive Samplers', *The Open Analytical Chemistry Journal*, 2, pp. 1–9. Available at: <https://benthamopen.com/contents/pdf/TOACJ/TOACJ-2-1.pdf> (Accessed: 27 April 2018).

Kolpin, D. W. *et al.* (2002) 'Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance', *Environmental Science & Technology*, 36(6), pp. 1202–1211.

Kot-Wasik, A. *et al.* (2007) 'Advances in passive sampling in environmental studies', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 602(2), pp. 141–163.

Kroupová, K. (2017) *Nové způsoby vzorkování pro vyhodnocení reálných remediačních studií*. Charles University.

Kuhlmann, F. M. and Fleckenstein, J. M. (2017) 'Antiparasitic Agents', in *Infectious Diseases*. Elsevier, p. 1345–1372.e2.

Kümmerer, K. (2009) 'Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I', *Chemosphere*. Pergamon, 75(4), pp. 417–434.

Kümmerer, K. (2010) 'Pharmaceuticals in the Environment', *Annual Review of Environment and Resources*. Annual Reviews, 35(1), pp. 57–75.

Landers, T. F. *et al.* (2012) 'A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential.', *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*. SAGE Publications, 127(1), pp. 4–22.

Loganathan, B. G. (2003) 'Comparison of passive in situ chemical extraction sampling (

PISCES ) and whole water sampling methods for PCB ...', *Organohalogen Compounds*, pp. 69–71.

Martin, H., Piepenbrink, M. and Grathwohl, P. (2001) 'CERAMIC DOSIMETERS FOR TIME-INTEGRATED CONTAMINANT MONITORING', *JPACSM 68 ...the Journal of Process Analytical Chemistry*. Available at: <http://www.infoscience.com/JPAC/ManScDB/JPACDBEntries/1014401235.pdf> (Accessed: 27 April 2018).

Martins, A. F. *et al.* (2011) 'Occurrence of the Antimicrobials Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Hospital Effluent and Study of Their Degradation Products after Electrocoagulation', *CLEAN - Soil, Air, Water*. Wiley-Blackwell, 39(1), pp. 21–27.

Mayer, P. *et al.* (2003) 'Equilibrium Sampling Devices', 186 A ■ *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es032433i> (Accessed: 22 April 2018).

Namieśnik, J. *et al.* (2005) 'Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer-Verlag, 381(2), pp. 279–301.

Nicholas, G. *et al.* (2002) *What are the limitations of PDB samplers?* Available at: <https://www.itrcweb.org/documents/pdbfaqs2.pdf> (Accessed: 25 April 2018).

Noor Rain, A. *et al.* (2005) 'In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method', *Tropical Biomedicine*, 22(2), pp. 165–170. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/3b49/711d6f86b50ea16ce82051b6b2f8c92f1faa.pdf> (Accessed: 8 May 2018).

Palmes, E. D. and Gunnison, A. F. (1973) 'Personal Monitoring Device for Gaseous



Contaminants', *American Industrial Hygiene Association Journal*. American Industrial Hygiene Association Journal , 34(2), pp. 78–81.

Popowska, M. *et al.* (2010) 'The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria.', *Journal of environmental quality*, 39(5), pp. 1679–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21043273> (Accessed: 4 May 2018).

Sherer, J. T. (2006) 'Pharmaceuticals in the environment.', *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. American Society of Health-System Pharmacists, 63(2), pp. 174–8.

Schafhauser, B. H. *et al.* (2018) 'Global review and analysis of erythromycin in the environment: Occurrence, bioaccumulation and antibiotic resistance hazards', *Environmental Pollution*. Elsevier, 238, pp. 440–451.

Szekely, G. and Didaskalou, C. (2016) 'Biomimics of Metalloenzymes via Imprinting', in *Molecularly Imprinted Catalysts*. Elsevier, pp. 121–158.

Tamtam, F. *et al.* (2008) 'Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions', *Science of The Total Environment*. Elsevier, 393(1), pp. 84–95.

Tong, L. *et al.* (2014) 'Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China', *Science of The Total Environment*. Elsevier, 497–498, pp. 180–187.

Vrana, B. *et al.* (2005) 'Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(10), pp. 845–868.

Zuccato, E., Castiglioni, S. and Fanelli, R. (2005) 'Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment', *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier, 122(3), pp. 205–209.

### ***Internetové zdroje***

Amoxilin. *Sukl* [online] 2016 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
[www.sukl.cz/download/pil/PI113440.doc](http://www.sukl.cz/download/pil/PI113440.doc)

Ciprofloxacin. *Sukl* [online] 2011 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC29037.pdf>

Erythromycin. *Medlineplus* [online] 201 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682381.html>

Flumequin. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database* [online] 2018 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3374>

Chlortetracyclín. *Drugs* [online] 2018 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<https://www.drugs.com/cons/chlortetracycline.html>

Lincomycin. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database* [online] 2018 [cit. 2018-05-04]. Dostupné z:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000540>

Metody pasivního vzorkování. *Tretiruka* [online] 2016 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z:  
<https://www.tretiruka.cz/news/metody-pasivniho-vzorkovani/>

Ofloxacin. *Sukl* [online] 2016 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PI93939.pdf&type=pil&as=ofloxacin-0-3-unimed-pharma-pil>

Spiramycin. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database* [online] 2018 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419898>

Streptomycin. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database* [online] 2018 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/streptomycin>

Sulfamethoxazol. *Sukl* [online] 2010 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z:  
<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC5290.pdf>